

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 198 35 856 A 1**

61 Int. Cl. 7:
C 07 H 21/00

21 Aktenzeichen: 198 35 856.3
22 Anmeldetag: 7. 8. 1998
43 Offenlegungstag: 17. 2. 2000

DE 198 35 856 A 1

71 Anmelder:
Roth, W. Kurt, Priv.-Doz. Dr.med., 65185
Wiesbaden, DE; Drostes, Christian, 60486
Frankfurt, DE

74 Vertreter:
Tiedtke, Bühling, Kinne & Partner, 80336 München

72 Erfinder:
gleich Anmelder

56 Entgegenhaltungen:

EP	5 69 237 A2
EP	5 23 557 A1
WO	97 40 193 A2
WO	91 10 746 A1
WO	90 13 667 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zum Nachweis von HBV

57 Es wird ein Verfahren zum Nachweis von HBV in einer Probe beschrieben, welches den Schritt des Aussetzens der Probe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) umfaßt, wobei das durch die PCR zu amplifizierende DNA-Stück einem bestimmten Teil des HBV-Genoms entspricht. Das Verfahren ist auf besondere Weise auf das sogenannte Taqman-System angepaßt. Hierzu werden ferner speziell angepaßte Primerpaare und Nachweissonden zur Verfügung gestellt.

DE 198 35 856 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Hepatitis B-Viren (HBV) in einer Probe mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Oligonukleotid-Primer und -Sonden, Kontroll-Plasmide sowie -Sonden sowie Test-Kits, die zum Einsatz für den PCR-Nachweis von HBV besonders gut geeignet sind.

Der Nachweis von HBV mittels DNA-Technik, insbesondere mittels Nukleinsäure-Amplifikationsreaktionen und hier vor allem über die PCR, gewinnt zunehmend an Bedeutung im Vergleich zum herkömmlichen Antikörper-Nachweis im Bereich Diagnostik und Therapie. Als Einsatzgebiet solcher diagnostischer Verfahren kommt beispielsweise die Transfusionsmedizin in Frage, wo der Aufbau von auf PCR basierenden Verfahren zur routinemäßigen Untersuchung von Spendermaterial auf das Vorhandensein von HBV ein starkes Bedürfnis darstellt. Dabei ist neben den üblichen Anforderungen an virologische molekulardiagnostische Systeme, wie eine hohe Empfindlichkeit, eine Erfassung aller Virusstämme eines Virustyps sowie eine hohe Validität des Verfahrens wegen des hohen Probendurchsatzes, ein besonderes Augenmerk auf die Geschwindigkeit und die Praktikabilität der Arbeitsabläufe zu richten.

Neben dem Einsatz im Blutspendewesen findet die PCR zum Test auf HBV-DNA in verschiedensten weiteren medizinischen Gebieten Anwendung. So ist beispielsweise der Nachweis von HBV in der internistischen Therapiekontrolle von unverzichtbarem Wert, da mittels der PCR eine Quantifizierung des Virusgehaltes im Blut erreichbar ist. Ein weiteres Beispiel für den Nachweis von HBV mittels PCR ist die Diagnostik der chronischen Hepatitis-B-Infektion. Hier kann ein falsch negatives Ergebnis in der virologischen Diagnostik, das regelmäßig in Verbindung mit einer bestimmten Virusmutante auftritt, durch Nukleinsäurenachweis vermieden werden.

Nachweisverfahren für HBV mittels der PCR-Technik wurden bisher bereits von einer Reihe von Autoren beschrieben; siehe z. B. O. Yukosuka in: "Diagnostic Molecular Microbiology" (D. H. Persing et al., Hrgs.), American Society of Microbiology, S. 322-326 (1993); A. Erhardt et al. in "J. Clin. Microbiol." 34(8), S. 1885-1891 (1996); P. P. U. Gang Yang et al. in "Blood" 81(4), S. 1083-1088 (1993).

Ein generelles Problem beim Nachweis von HBV mittels PCR-Technik stellt die Variabilität der DNA-Sequenzen verschiedener HBV-Genotypen dar, die in die Genotype A, B, C, D und F unterteilt werden können und für die repräsentative Einzelisolate über die folgenden GenBank-Zugangsnummern zugänglich sind:

X 69798, D 00329, M 54923, J 02203, X 65257, V 01460,
X 65258, X 65259, X 59795, X 02496, X 97848, D 23684,
D 23682, D 23681, X 51970, X 80925, X 80926, X 80924,
D 50522, M 32138, X 75665, X 75656, X 75658, X 75663,
X 75657, V 00867, X 59795, S 50225, D 50521, D 50489,
D 16667, D 1666, X 97851, X 97850, X 97849, X 98077.

Dabei besteht die Schwierigkeit, für das Primerpaar und ggf. für die bezüglich des Amplikons spezifische Oligonukleotid-Sonde geeignete homologe Sequenzen unter den verschiedenen Isolaten auszuwählen, um einen positiven Nachweis aller HBV-Genotypen zu ermöglichen.

Ungeachtet der bekannten Nachweisverfahren hat die PCR-Reaktion zum Nachweis von HBV noch keine weite Verbreitung gefunden. Neben der vorstehend genannten Schwierigkeit ist der Grund hierfür in dem zeitlichen und personellen Arbeitsaufwand für die Durchführung des Verfahrens zu suchen. Besonders die Analyse des Reaktionsproduktes stellt ein Problem dar, das die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion bislang spezialisierten Laboratorien vorbehält: Bei allen bisher beschriebenen HBV-Nachweisen mittels PCR, einschließlich der zur Zeit verfügbaren Automatisierungsansätze, folgt auf die eigentliche PCR-Reaktion eine Reihe von weiteren Bearbeitungsschritten. Diese erforderlichen zusätzlichen Schritte bergen die Gefahr einer Kontamination. Insbesondere bei den zur Zeit üblichen Detektionsverfahren zum Nachweis des amplifizierten Produktes werden im Zuge des Öffnens der Reaktionsgefäße DNA-Fragmente in Aerosolform freigesetzt, die nachfolgende Reaktionen fälschlicherweise positiv erscheinen lassen. Zum Aufwand für die Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen durch die PCR, s. z. B. S. Kwok und R. Higuchi in "Nature", vol. 339, S. 237-238 (1989).

Demnach besteht die Aufgabe der Erfindung darin, ein Verfahren zum Nachweis von HBV in einer Probe auf der Grundlage einer Polymerase-Reaktion (PCR) zur Verfügung zu stellen, welches relativ HBV-Genotypen-unspezifisch ist und somit die gängigen HBV-Varianten erfaßt, und welches einen empfindlichen, schnellen und auch für die Routine praktikablen Nachweis mit möglichst geringer Kontaminationsgefahr erlaubt.

Gegenstand vorliegender Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von HBV in einer Probe gemäß Anspruch 1. Dabei entspricht das durch die PCR zu amplifizierende DNA-Stück einem Teil des HBV-Genoms, der im Bereich von der Position 242 bis zur Position 482 des HBV-Genoms, gezählt von der einzigen EcoRI-Schnittstelle im HBV-Genom, liegt. Bevorzugte Ausführungsformen des Verfahrens sind in den Unteransprüchen zu Anspruch 1 definiert.

Weitere Gegenstände betreffen ein Oligonukleotid gemäß Anspruch 16, eine Oligonukleotid-Zusammensetzung nach Anspruch 19, ein Plasmid nach Anspruch 22 sowie ein Test-Kit nach Anspruch 23, nämlich Gegenstände, die zum Einsatz im erfindungsgemäßen PCR-Verfahren zum Nachweis von HBV hervorragend geeignet sind.

Als Basis für die vorliegende Erfindung wurde eine Konsensus-Sequenz unter den bekannten HBV-Varianten ermittelt, die in dem Sequenz-Listing-Protokoll als SEQ ID Nr. 1 angegeben ist. Ausgehend von dieser Konsensus-Sequenz wurde dann derjenige konservierte DNA-Bereich zur Amplifizierung mittels PCR ausgewählt, der die aufgabengemäße gewünschte PCR-Reaktion erlaubt. Die gezielte Auswahl des durch die PCR zu amplifizierenden DNA-Stücks aus dem Teil des HBV-Genoms, der im Bereich von der Position 242 bis zur Position 482 und insbesondere im Bereich von der Position 340 bis zur Position 431 des HBV-Genoms liegt, ermöglicht ein besonders empfindliches und effizientes und dabei besonders kontaminationsarmes PCR-System unter Erfassung aller bekannter HB-Virusstämme.

Der besondere Vorteil der Erfindung besteht dementsprechend darin, daß das auf das spezielle Amplikon abzielende,

erfindungsgemäße PCR-Verfahren den Einsatz des sog. TaqMan-Systems erlaubt, welches an sich bekannt ist (s. z. B. K. J. Livak et al in "PCR Methods Applic." Bd. 4, S. 357-362 (1995); Lyamichev et al. (1993)).

Nach diesem TaqMan-Prinzip definieren zunächst der Forward- bzw. Sense-Primer und der Reverse- bzw. Antisense-Primer wie bei einer üblichen PCR das zu amplifizierende DNA-Stück (Amplikon). Darüber hinaus wird eine Oligonukleotid-Sonde eingesetzt. Eine Besonderheit dieses Systems besteht darin, daß die Oligonukleotid-Sonde bereits zur PCR-Reaktion zugegeben wird. Die Amplikon-spezifische Oligonukleotid-Sonde ist am 5'-Ende mit einem Fluoreszenz-Reporter R und am 3'-Ende mit einem Fluoreszenz-Quencher Q gekoppelt. Nach Anbindung der so markierten Oligonukleotid-Sonde an die komplementäre Sequenz des Amplikons wird die vom Reporterfarbstoff emittierte Fluoreszenz infolge Energietransfer durch den Fluoreszenz-Quencher Q gequenchert. Die vom Quencherfarbstoff emittierte Fluoreszenz wird nicht detektiert. Bei der Polymerisation des Amplikons im Zuge der PCR erfolgt eine zumindest teilweise Verdrängung der markierten Oligonukleotid-Sonde vom Strang, verbunden mit einem Abbau Oligonukleotid-Sonde durch die der DNA-Polymerase eigenen 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, wonach der Reporter R und der Quencher Q separat in Lösung vorliegen und das Quenchen des Reporters unterbleibt. Nach Lichtanregung, vorzugsweise mittels Laser, kann nunmehr die vom Fluoreszenzfarbstoff R emittierte Fluoreszenz detektiert werden; es kommt zu einem Nettoanstieg der Reporter-Fluoreszenz. Die Messung kann mit diesem System während oder unmittelbar nach der eigentlichen PCR-Reaktion erfolgen, erfordert daher keine weiteren Arbeitsschritte.

Alternative Ausführungsformen zu diesem TaqMan-Gründprinzip sind ohne weiteres möglich. So können beispielsweise die Positionen des Reporter- und des Quencher-Farbstoffs an den jeweiligen Enden der Oligonukleotid-Sonde vertauscht oder in Zwischenpositionen des Oligonukleotids verlagert werden.

Als Fluoreszenz-Reporterfarbstoff eignet sich beispielsweise 6-Carboxy-Fluorescein (FAM), Tetrachloro-6-carboxy-Fluorescein (TET), 2,7-Dimethoxy-4,5-dichlor-6-carboxy-Fluorescein (JOE) und Hexachloro-6-carboxy-Fluorescein (HEX), und als Fluoreszenz-Quencherfarbstoff eignet sich beispielsweise 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin (TAMRA), wobei die Farbstoffe über an sich bekannte Methoden an das gewünschte Ende der Oligonukleotid-Sonde kovalent gebunden sind (der Reporter-Farbstoff typischerweise an das 5'-Ende und der Quencher-Farbstoff üblicherweise an das 3'-Ende des Oligonukleotids). Entsprechende Detektoren können die emittierte Fluoreszenz bestimmen, z. B. im Wellenlängenbereich zwischen 500 und 660 nm.

Ogleich das beschriebene TaqMan-System für das erfindungsgemäße Verfahren besonders bevorzugt ist, kann der Nachweis von HBV auch auf andere Weise erfolgen, insbesondere durch das Anbinden einer Oligonukleotid-Sonde an die durch die PCR amplifizierte DNA-Sequenz, wobei die Sonde dann eine geeignete Markierung trägt, beispielsweise eine radioaktive Markierung, eine herkömmliche Fluoreszenz-Markierung oder eine immunchemisch oder elektrochemisch detektierbare Hapten-Markierung. Es kann ferner eine sehr einfache Verlaufskontrolle der PCR erfolgen durch Einsatz von dsDNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen wie Ethidiumbromid oder SYBRTM Green I.

Es kann auch anstelle einer einzelnen Oligonukleotid-Sonde ein Sondenpaar eingesetzt werden, das unter Hybridisierungsbedingungen am Amplikon benachbart zu liegen kommt, und folglich ein Fluoreszenz-Donor am 3'-Ende (oder 5'-Ende) der einen Oligonukleotid-Sonde auf dem Amplikon benachbart zu einem Fluoreszenz-Akzeptor am 5'-Ende (bzw. 3'-Ende) der anderen Oligonukleotid-Sonde lokalisiert ist. Bei einer solchen In-situ-Detektion erfolgt die Fluoreszenzmessung nicht über das Aufheben eines Fluoreszenz-Quenchens, sondern die vom Fluoreszenz-Donor emittierte Fluoreszenz wird – falls die amplifizierte DNA-Sequenz vorliegt – zur Anregung auf den Fluoreszenz-Akzeptor der benachbarten Oligonukleotid-Sonde mittels Fluoreszenzresonanz-Energietransfer übertragen. In diesem Fall wird demnach der Fluoreszenz-Donor mit einer geeigneten Lichtquelle angeregt, wobei eine einfache Lichtquelle wie eine LED ausreicht, während die vom Fluoreszenz-Akzeptor emittierte Fluoreszenz schließlich gemessen wird. Wie beim TaqMan-System wird auch bei diesem Ansatz sowohl die Amplifikation als auch die Fluoreszenz-Detektion in demselben, geschlossenen Reaktionsbehälter vollzogen, was die Kontaminationsgefahr stark mindert, da das Reaktionsgefäß zur Detektion nicht geöffnet werden muß.

Als ein weiteres Beispiel für ein sehr gut geeignetes Nachweissystem ist der Einsatz der sogenannten "molecular beacons" zu nennen. Dieses System wird beschrieben von A. S. Piatek in "Nature Biotechnology", 16(4), S. 359-363 (1998).

Es hat sich herausgestellt, daß zum erfindungsgemäßen HBV-Nachweis mittels Oligonukleotid-Sonden solche Oligonukleotide eingesetzt werden können, die entweder zu dem einen oder zu dem anderen Strang des Amplikons komplementär sind.

Die vorliegende Erfindung ist besonders auf das TaqMan-System angepaßt, wobei es neben der Auswahl der HBV-Typen-unspezifischen Konsensus-Sequenz insbesondere auf die Wahl der geeigneten Oligonukleotide sowohl hinsichtlich der Primer als auch hinsichtlich der bereits in der PCR-Reaktion einzusetzenden, Amplikonsequenz-spezifischen Sonde ankommt. Um unter der Voraussetzung, daß die bekannten HBV-Sequenzvariationen nachgewiesen werden können, einen TaqMan-Ansatz zu erlauben, welcher effizient und für den Routineeinsatz zuverlässig arbeitet, sind erfindungsgemäß folgende Bedingungen weiter bevorzugt:

Die zu amplifizierende DNA (das Amplikon) sollte relativ kurz sein und vorzugsweise eine Länge von 50 bis 100 Basenpaare aufweisen. Auf diese Weise kann die Extensionszeit bei relativ niedriger Temperatur kurz gewählt werden. Das für die PCR eingesetzte Primer-Paar weist vorzugsweise eine gleiche Schmelztemperatur (errechnet über die "nearest neighbour"-Methode) oder eine um höchstens 2,5°C unterschiedliche Schmelztemperatur auf. Der Schmelzpunkt der Oligonukleotid-Sonde sollte eine Schmelztemperatur aufweisen, die höher, beispielsweise mindestens 5°C und vorzugsweise mindestens 10°C über dem Schmelzpunkt der Primer liegt. Die Schmelztemperatur der Primer liegt dabei geeigneterweise im Bereich von 55°C bis 65°C, vorzugsweise im Bereich von 58°C bis 62°C und insbesondere bei 59°C bis 60°C. Die Länge der Primer beträgt vorzugsweise 18 Basen oder mehr und liegt beispielsweise im Bereich von 18-25 und insbesondere im Bereich von 20-24 Basen. Um unspezifische Primer-Bindungen zu reduzieren, werden ferner solche Primer bevorzugt, die ein relativ instabil bindendes 3'-Ende aufweisen. Folglich werden solche Primer bevorzugt, bei denen die Summe aus G-Nukleotiden und C-Nukleotiden in den letzten fünf am 3'-Ende gelegenen Nukleotiden den Wert 2 nicht übersteigt. Für die Oligonukleotid-Sonde ist bevorzugt, daß das auf die Fluoreszenz-Reporter-Markierung folgende Nukleotid nicht Guanin ist, da die von dem Fluoreszenz-Reporter emittierte Fluoreszenz offenbar auch durch

die Base Guanin gequenchet werden kann und somit ein nicht erwünschtes Autoquenching hervorruft. Ferner sollte die Oligonukleotid-Sonde gute Hybridisierungs-Charakteristika aufweisen, die beispielsweise darauf beruhen, daß der GC-Gehalt zwischen 45 und 55% liegt, einen über die gesamte Sondenregion möglichst konstant gehaltenen Schmelzpunktverlauf aufweist und einen Gesamtschmelzpunkt ergibt, der über den Primer-Schmelzpunkten liegt. Ferner sollte eine Komplementarität der freien 3'-Enden der Primer zur Sonde vermieden werden, da in diesem Fall die Primer an der Sondensequenz verlängert würden und die Oligonukleotide für die Reaktion ausfielen. Es ist somit zu bedenken, daß der Primer, von dem die Strangentfernung der Sonde ausgeht, nicht bei höherer Temperatur als die Sonde anlagern darf, denn in diesem Falle würde die schon beim Abkühlen einsetzende Synthese des komplementären Stranges die Sondenanlagerung verhindern. Die Wahl eines hohen Primer-Schmelzpunktes wäre ein probates Mittel, in der Primerbindungs-Region vorkommende variable Positionen durch eine verringerte Bindungs-Stringenz auszugleichen. Im TaqMan-System ist diese Möglichkeit wegen der oben beschriebenen Erfordernisse nicht gegeben. Soll ein virologischer Test aufgebaut werden, sollten also auch im Primer-Bereich variable Positionen umgangen oder auf andere Weise ausgeglichen werden.

Unter Beachtung der vorstehend beschriebenen, geeigneten Bedingungen besteht eine besonders vorteilhafte Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens darin, daß als PCR-Primer Oligonukleotide mit der SEQ ID Nr. 2 sowie SEQ ID Nr. 6 eingesetzt werden. Darin einzuschließen sind Sequenzhomologe dieser Oligonukleotide mit der Maßgabe, daß diese Sequenzhomologe unter den gewählten PCR-Bedingungen ein mit der zu amplifizierenden DNA spezifisches DNA-Hybrid bilden können. Wie aus der Sequenzdarstellung in SEQ ID Nr. 2 ersichtlich, bestehen bezüglich dieses Sense- bzw. Forward-Primers geringfügige Variabilitäten, nämlich durch das Vorhandensein oder das Weglassen der Base C am 5'-Ende, der Wahl zwischen C und G für N₁, der Wahl zwischen C und T für N₂ sowie der Wahl zwischen C und T für N₃. Diese Alternativen resultieren aus den Variationsmöglichkeiten der HBV-Konsensussequenz.

Vorzugsweise wird als Sense-Primer eine Zusammensetzung aus Oligonukleotiden eingesetzt, die die Oligonukleotide mit den SEQ ID Nrn. 3, 4 und 5 umfassen. Diese als "Wobble-Primer" zu bezeichnende Ansammlung von Oligonukleotid-Primern stellt damit sicher, daß alle gängigen HBV-Subtypen erfaßt werden.

Kombiniert mit diesem besonderen Sense- und Antisense-Primerpaar hat sich vor allem der Einsatz einer Oligonukleotid-Sonde mit der SEQ ID Nr. 7 oder der zu dieser Sequenz komplementären Sequenz als besonders wirksam erwiesen. Entsprechend der üblichen Vorgehensweise nach dem TaqMan-Prinzip ist diese Oligonukleotid-Sonde am einen Ende, vorzugsweise am 5'-Ende, mit einem Fluoreszenz-Reporter und entsprechend am jeweils anderen Ende, d. h. vorzugsweise am 3'-Ende, mit einem Fluoreszenz-Quencher markiert.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt vorteilhaft eine interne Validitätskontrolle zur Verfügung. Diese Kontrolle basiert auf dem Problem, daß im Zuge der Testung von Probenmaterial mit Hilfe der PCR bei einem Ausbleiben eines Reaktionsproduktes nicht folgerichtig auf ein negatives Ergebnis der Reaktion geschlossen werden kann. Denn biologische Proben, wie beispielsweise im Blutspendewesen eingesetzte Plasma-Pools, können Substanzen enthalten, die den Ablauf der Reaktion soweit behindern, daß eventuell in der Probe vorhandenes Virusmaterial unentdeckt bleibt (bei Plasma-Pools in der Regel bei 1% der getesteten Proben). Solche Substanzen werden als PCR-Inhibitoren bezeichnet, und dieses Problem erfordert die Durchführung einer Inhibitionskontrolle für jede einzelne Reaktion im Rahmen eines Testdurchlaufs, wie von R. W. Cohen et al. beschrieben in: "J. Clin. Microbiol." 30(12), S. 3185-3189 (1992).

Im Rahmen vorliegender Erfindung wird für eine solche Kontrolle in der PCR eine Kontrollsequenz koamplifiziert und gleichzeitig mit der Amplifikation der HBV-spezifischen Sequenz durchgeführt, um zusätzliche externe Kontrollansätze zu vermeiden. Da nur bei identischen oder nahezu identischen Zielsequenzen davon ausgegangen werden kann, daß gleiche Amplifikationsbedingungen herrschen, sollte entsprechend die tatsächliche Virussequenz zur Kontrolle herangezogen werden. Die koamplifizierte Kontrollsequenz ist somit zumindest in der Primerregion mit der zu amplifizierenden HBV-Sequenz homolog, wobei auch die Amplikonlänge entsprechend gleich sein sollte. Um aber ein positives Kontrollergebnis mit dem eventuell in der Probe vorhandenen Wildtyp-Virus zu unterscheiden, wird zweckmäßigerweise in die zu amplifizierende Kontrollsequenz, die dem zu untersuchenden Bereich des HBV-Genoms homolog ist, eine geringfügige Mutation zur Differenzierung gegenüber dem Wildtyp-Ansatz eingeführt.

Folglich ist vorzugsweise die zur Kontrolle koamplifizierte Kontrollsequenz mit Ausnahme der zum Hybridisierungsnachweis herangezogenen Sondenregion mit der zu amplifizierenden HBV-Sequenz identisch, während die Kontrollsequenz mit einer für den mutierten Bereich spezifischen Oligonukleotid-Sonde nachgewiesen wird.

Die für eine solche Kontrollsequenz eingeführte Mutation kann im Prinzip willkürlich sein. Eine Basenkomposition für die Kontrollsequenz, die speziell auf das Verfahren nach dem TaqMan-Prinzip abgestimmt ist und gleichzeitig eine möglichst geringe Abweichung von der Originalsequenz erfordert, ist durch die Sequenz mit der SEQ ID-Nr. 8 wiedergegeben.

Selbstverständlich sind dabei Sequenzvarianten bzw. -modifikationen wie Insertionen, Deletionen, Inversionen oder dergleichen umfaßt, mit der Maßgabe, daß diese möglichen Sequenzvarianten mit dem Sequenzbereich von Position 47 bis Position 138 der SEQ ID Nr. 8 identisch sind. Dieser relevante Sequenzbereich der Positionen 47 bis 138 entspricht somit dem bevorzugt zu amplifizierenden HBV-Genombereich von Position 340 bis Position 431 mit den entsprechenden Sense- bzw. Antisense-Primer-Paaren (vgl. SEQ ID Nrn. 2 bzw. 3, 4 und 5 sowie 6). Spezifisch für diese Kontrollsequenz ist die mutierte Sondenregion im Bereich der Positionen 77 bis 100. In Verbindung mit dieser spezifischen Kontrollsequenz ist somit eine Kontrollsequenz-spezifische Oligonukleotid-Sonde mit der SEQ ID Nr. 9 oder eine zu dieser Sequenz komplementäre Sequenz einzusetzen.

Um den Kontrollansatz vom HBV-Wildtyp-spezifischen Nachweis in ein und demselben Ansatz auch hinsichtlich der Detektion unterscheidbar zu machen, sollte die Kontrollsequenz-spezifische Oligonukleotid-Sonde eine andere Markierung tragen als die HBV-spezifische Oligonukleotid-Sonde. Dies geschieht nach dem bevorzugten TaqMan-Ansatz geeigneterweise durch eine andersartige Fluoreszenz-Reporter-Markierung, wonach eine Differenzierung infolge unterschiedlicher Licht-wellenlängen-Emission möglich ist, während die Fluoreszenz-Quencher-Markierung beider Sondenarten gleich sein kann. Geeignet ist beispielsweise eine Fluoreszenzmarkierung von 5'-FAM sowie 3'-TAMRA bzgl. der HBV-Wildtyp-spezifischen Sonde und eine Fluoreszenzmarkierung von 5'-TET oder 5'-HEX sowie 3'-TAMRA bzgl. der

Kontrollsequenz-spezifischen Sonde. Die für die interne Validitätskontrolle nützliche Kontrollsequenz ist geeigneterweise in einem Plasmid enthalten, wobei ein DNA-Stück mit der Sequenz von SEQ ID Nr. 8 oder die genannten Sequenzvarianten davon über gängige und bekannte Methoden in ein übliches Plasmid inseriert ist. Dieses Plasmid kann zur Kontrolle zusammen mit der zu untersuchenden Probe in dem gleichen Amplifikations-Ansatz eingesetzt werden. Es hat sich im Rahmen experimenteller Untersuchungen herausgestellt, daß eine Inhibitionskontrolle ohne Verschlechterung der Sensitivitätsgrenze des PCR-Assays dann besonders zuverlässig möglich ist, wenn die Kontrollsequenz, beispielsweise das diese Sequenz enthaltende Plasmid, für den Koamplifikations-Ansatz nur in einer niedrigen Startkopienzahl eingesetzt wird, etwa mit 20 Kopien oder weniger, vorzugsweise mit 15 Kopien oder weniger und insbesondere mit 10 Kopien oder weniger.

Ein weiterer Schutz vor Produkt-Kontaminationen bietet die an sich bekannte Verwendung des Uracil-N-Glycosylase-Systems, siehe M. C. Longo et al. in: "Gene", Bd. 93, S. 125-128 (1990). Des weiteren ist es vorteilhaft, etwas DMSO, beispielsweise 0,5 bis 1,5% (v/v), in den PCR-Ansatz mit hineinzugeben.

Desweiteren stellt die vorliegende Erfindung die oben spezifizierten Oligonukleotide zur Verfügung, die als Primer oder Oligonukleotid-Sonden für den PCR-Ansatz gemäß der bevorzugten Ausführungsform besonders gut geeignet sind.

Diese für den HBV-Nachweis mittels PCR besonders geeigneten Mittel betreffen somit den Sense-Primer mit SEQ ID Nr. 2 bzw. das entsprechende Triple-Gemisch von SEQ ID Nr. 3, 4 und 5, und den Antisense-Primer mit SEQ ID Nr. 6, sowie Primer-Zusammensetzungen von Oligonukleotiden mit diesen Sequenzen. Ferner sind dies die als Oligonukleotid-Sonden einzusetzenden Nukleotidsequenzen von SEQ ID Nr. 7 (HBV-Wildtyp-spezifisch) sowie SEQ ID Nr. 9 (kontroll-spezifisch), wobei diese Oligonukleotid-Sonden geeigneterweise wie oben beschrieben markiert sein können. Diese Oligonukleotid-Primer und/oder Oligonukleotid-Sonden können je nach Wunsch in entsprechenden Oligonukleotid-Zusammensetzungen zusammengefaßt sein.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung besteht in einem Test-Kit zum Nachweis von HBV, welcher mindestens eine solche, wie beschriebene, Oligonukleotid-Zusammensetzung, vorzugsweise mit allen erforderlichen Primern und Sonden, und ferner für eine PCR-Reaktion erforderliche Nukleotide und eine hitzestabile DNA-Polymerase enthalten. In der bevorzugten Ausführungsform enthält der Test-Kit ferner das oben beschriebene Kontroll-Plasmid sowie die Kontroll-Hybridisierungs-Sonde zur internen Validitätskontrolle.

Die vorliegende Erfindung wird anhand folgender, jedoch nicht beschränkender Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1: Durchführung des Wildtyp-Assays

Als experimenteller Beleg zur Wirksamkeit des Wobble-Primers wurden zum HBV-spezifischen Nachweis zwei Referenz-Seren als Proben herangezogen: einmal ein Eurohep-1-Referenzserum für HBV-Genotyp A, zum anderen ein Eurohep-2-Referenzserum für HBV-Genotyp D. Für den Wildtyp-Assay wurde folgendermaßen vorgegangen:

Ein Reaktionsvolumen von 50 µl enthält 1X TaqMan-Puffer A (10X-Puffer = 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,1 mM EDTA, 600 nM 6-Carboxy-X-Rhodamin), 6 µM MgCl₂, 200 nM dATP, dCTP und dGTP (jeweils), 700 nM dUTP, 150 nM Oligonukleotid-Primer (SEQ ID Nr. 3 oder 4 als Sense-Primer und SEQ ID Nr. 6 als Antisense-Primer), 100 nM Oligonukleotid-Sonde (SEQ ID Nr. 7), 2 U Uracil-N-Glycosylase und 1,25 U thermostabile DNA-Polymerase (Ampli-Taq Gold™). Die Oligonukleotid-Sonde ist am 5'-Ende mit FAM und am 3'-Ende mit TAMRA markiert. Nach Extraktion von Patientenserum mit dem Quiagen™-Viral-RNA-Kit (Quiagen, Hilden) wurde in die Reaktion 10 µl Extrakt eingebracht und nach folgendem Programm im Perkin-Elmer 7700-Sequence-Detection-System analysiert: Präinkubation 50°C für 2 min und 95°C für 10 min, anschließend drei Zyklen bestehend aus 95°C für 15 s und 60°C für 45 s, gefolgt von 42 Zyklen bestehend aus 93°C für 5 s und 60°C für 20 s.

Der Vergleich der Sensitivität des Assays mit Genotyp A-Referenzserum und mit Genotyp D-Referenzserum zeigt keine signifikante Differenz in den erhaltenen Resultaten. Somit wurde gezeigt, daß eine einzelne Basen-Fehlpaarung die Sensitivität des Assays unbeeinflusst läßt.

Ferner wurde belegt, daß bei Einsatz der Sense-Primer mit SEQ ID Nr. 3, 4 und 5, geeigneterweise zu gleichen Teilen eingesetzt, eine alle HBV-Genotypen erfassende DNA-Amplifikation gestattet, wobei die Sensitivität sehr hoch ist: Nachweisbar sind in diesem optimierten TaqMan-System etwa 5 bis 10 Kopien HBV, die in dem Probenansatz vorliegen.

Beispiel 2

A) Herstellung der Standardsequenz durch gerichtete Mutagenese

Die Durchführung der experimentellen Schritte orientiert sich an früheren Erfahrungen der eigenen Arbeitsgruppe, s. B. Rüster et al. in: "Analytical Biochemistry" 224, S. 597-600 (1995).

Ein extrahiertes Hepatitis-B-Referenzserum (Eurohep 1, Eurohep 2, 1 : 1 gemischt) wurde unter folgenden Bedingungen amplifiziert. 50 µl Reaktionsvolumen mit der Zusammensetzung: 10 mM Tris-HCl, pH 8,8; 10 mM KCl; 0,002% Tween 20™, 80 µM dATP, dTTP, dCTP, dGTP (jeweils); 400 nM Primer HBVsi1 (ACTCGTGGTGGACTTCTCTC), 400 nM Primer HBVSOAS (ACGACGGACCACACTGACCAGTCAAC-CAGGACAAGTTGGAGGACA), 1 U UI™ DNA-Polymerase und 5 µl Serumextrakt. Erhitzen auf 80°C für 10 min. Zugabe von 1,25 mM MgCl₂, Erhitzen auf 95°C für 2 min. Anschließend 5 Zyklen 94°C für 25 s, 55°C für 30 s, 70°C für 30 s und 40 Zyklen 94°C für 25 s und 68°C für 45 s.

Anschließend wurde das gleiche Material unter gleichen Bedingungen amplifiziert, allerdings mit Primern HBVSO5 (TGACTGGTCAGTGTGGTCCGTCGTTATCATCTTCTCTTCATCCTG) und HBV5 (ACTAGTAACT-GAGCCAGGAGAAAC).

Beide Produkte wurden nach Elektrophorese aus einem Agarosegel mit dem Gene-Clean-II-Kit, Dianova, Hamburg, eluiert und vereinigt. 10 µl des Vereinigungsproduktes wurden folgenden Reaktionsbedingungen unterworfen: 10 mM Tris-HCl, pH 8,8; 10 mM KCl; 0,002% Tween 20™; 80 µM dATP, dTTP, dCTP, dGTP (jeweils); 1,25 mM MgCl₂. 10

Zyklen 94°C für 15 s und 68°C für 1 min.

5 µl aus dem Reaktionsprodukt wurden unter folgenden Bedingungen amplifiziert: 50 µl Reaktionsvolumen, 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 200 µM dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 200 nM Primer HBVsil, 200 nM Primer HBV5 (Sequenzen s. oben), 40 Zyklen: 94°C für 20 s, 60°C für 30 s, 68°C für 45 s. Vordenaturierung 10 min 95°C, Nachextension 70°C für 10 min.

Nachfolgend wurde eine Gelelektrophorese und eine GeneClean-Elution wie beschrieben durchgeführt.

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TA-cloning Kit von Invitrogen in E.coli kloniert und die erhaltenen Plasmide hinsichtlich ihrer Amplifizierbarkeit mit der Standardsonde überprüft. Hierzu wurden dem PCR-Protokoll für den Wildtyp-Assay (s. Beispiel 1) noch 100 nM der Kontrollsequenz-spezifischen Oligonukleotid-Sonde (SEQ ID Nr. 9) hinzugefügt. Die Kontrollsonde war am 5'-Ende mit TET und am 3'-Ende mit TAMRA markiert. Der Klon mit dem besten Ergebnis wurde angezüchtet und die Plasmide nach Maxipräparation bei -80°C gelagert.

Die Sequenz des Inserts wurde mit Hilfe des Taq Cycle Sequencing Core-Kits, Perkin-Elmer, Weiterstadt, nach Herstelleranleitung bestimmt. Die Sequenz entspricht der SEQ ID Nr. 8.

B) Experimentelle Implementation des Standardplasmids in den Assay

Die DNA-Quantifizierung des Plasmids und die anschließende Sensitivitätsbestimmung der PCR hinsichtlich der Sensitivität für den Kontrollstandard wurde nach dem Protokoll für den Wildtyp-Assay (s. Beispiel 1) mit 100 nM beider Sonden durchgeführt. Die Experimente ergaben eine Sensitivität von 20 Plasmiden pro Ansatz in 100% der Fälle (n > 500), 10 Plasmide in 99,97% der Fälle (n = 30), 7 Plasmide in 80% der Fälle (n = 20) und die sporadische Detektion von einem einzigen Plasmid im Reaktionsansatz.

Überprüfung des Einflusses von Extraktkomponenten auf die Reaktion: Es wurden 7 bzw. 70 Plasmide nach erwähntem Protokoll amplifiziert (n = 40), dabei wurde der Hälfte der Ansätze 10 µl Extrakt aus gepooltem Hepatitis B-negativem Blutspenderplasma, der anderen Hälfte das gleiche Volumen Wasser zugefügt. Hierbei wurden keine Differenzen zwischen den Ansätzen mit Poolmaterial gegenüber denen mit Wasser gesehen.

Überprüfung des Einflusses des Kontrollstandards auf die Sensitivität für den Wildtyp: Verdünnungsreihen der Hepatitis B-Referenzseren Eurohep 1 bzw. Eurohep 2 wurden zusammen mit einer 20 Plasmiden entsprechenden Menge an Kontrollsequenz amplifiziert. Diese Ansätze wurden parallel mit Ansätzen ohne Kontrollsequenz amplifiziert. Es ergab sich keine Differenz in der Wildtyp-Sensitivität. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 1 gezeigt, wobei "+" ein zur Detektion ausreichendes Signal und "-" ein Ausbleiben eines positiven Signals (d. h. ein negatives Ergebnis) bedeuten.

Tabelle 1

Experimentelle Ergebnisse zur Sensitivitätsbestimmung des Wildtyp-Assays mit und ohne Inhibitionskontrollstandard

HBV-Genome pro ml	Eurohep 1		Eurohep 2		Kontrollstandard	
	ohne Standard	mit St.	ohne St.	mit St.	kein St.	Standard
1000	+	+	+	+	--	++
500	+	+	+	+	--	++
250	+	-	-	-	--	++
125	+	+	-	-	--	++
75	-	-	-	-	--	++

Überprüfung der Interferenz der Sondensignale

Es konnte gezeigt werden, daß die Detektion eines Sondensignals von der Standardsonde kein Signal im Detektionsbereich des Wildtyps erzeugt und umgekehrt. Die Emission des Fluoreszenzfarbstoffs FAM ist also sowohl von der des HEX als auch von der des TET mit ausreichender Trennschärfe zu detektieren.

Beispiel 3: Protokoll des PCR-Ansatzes mit Inhibitionskontrollstandard

Folgendes Protokoll erwies sich nach abschließender experimenteller Validierung als besonders gut geeignet für die Durchführung des Assays mit Standard:

50 µl Reaktionsvolumen enthalten:

1 × TAQMAN-PUFFER A mit ROX

4,5 mM MgCl₂

200 µM dATP, dCTP, dGTP

700 µM dUTP

100 nM Sense-Primer HBVSC (SEQ ID Nr. 3)

100 nM Sense-Primer HBVST (SEQ ID Nr. 4)

100 nM Sense-Primer HBVSG (SEQ ID Nr. 5)	
300 nM Antisense-Primer HBVU (SEQ ID Nr. 6)	
100 nM Wildtyp-Sonde p380 (SEQ ID Nr. 7)	
100 nM Kontroll-Sonde STDSO (SEQ ID Nr. 9)	
1% (v/v) DMSO	5
1 U Uracil-N-Glycosylase	
1,25 U AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	
20 Plasmide Inhibitionskontrollstandard (mit SEQ ID Nr. 8, s. Beispiel 2)	
10 µl Serumextrakt	
ad 50 µl mit destilliertem Wasser	10

Amplifikationsbedingungen

55°C für 2 min. 95°C für 10 min. drei Zyklen bestehend aus 95°C/15 s und 60°C/45 s, 40 Zyklen bestehend aus 93°C/10 s und 60°C/20 s. 15

Amplifikation im Perkin-Elmer 7700 bzw. 9600+7200 gemäß Betriebsanleitung. Die Validierung des Assays ergab unter Bedingungen des Spenderscreening mit Hilfe von 96-Positionen Plasmapools eine Sensitivität von 500 Viren/ml Einzelspendermaterial im Pool für beide Eurohep-Referenzseren. Die Ergebnisse sind in den Fig. 1a)–1f) gezeigt.

Bei Experimenten an in Negativserum verdünntem Material waren in Einzelfällen bis zu 75 Viren/ml nachzuweisen. 20

Beispiel 4

Weiteres Protokoll des PCR-Ansatzes mit Inhibitionskontrollstandard:

50 µl Reaktionsvolumen enthalten:	25
1 × TAQMAN-PUFFER A mit ROX	
3,5 mM MgCl ₂	
200 µM dATP, dCTP, dGTP	
400 µM dUTP	30
200 nM Sense-Primer IIBVSC (SEQ ID Nr. 3)	
200 nM Sense-Primer HBVST (SEQ ID Nr. 4)	
200 nM Sense-Primer HBVSG (SEQ ID Nr. 5)	
600 nM Antisense-Primer IIBVU (SEQ ID Nr. 6)	
200 nM q380 Wildtyp-Sonde (komplementär zu SEQ ID Nr. 7)	35
50 nm STDSO (SEQ ID Nr. 9)	
0,5–1,5% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)	
0,5 U Uracil-N-Glycosylase	
1,25 U AmpliTaq™ Gold DNA-Polymerase	
20 Plasmide Inhibitionskontrollstandard (mit SEQ ID Nr. 8, s. Beispiel 2)	40
10 bzw. 20 µl Serumextrakt	
ad 50 µl mit destilliertem Wasser	

Amplifikationsbedingungen

50°C für 2 min. 95°C für 10 min. drei Zyklen bestehend aus 95°C/15 s, 60°C/45 s, 40 Zyklen bestehend aus 93°C/10 s und 60°C/40 s. 45

Die Ergebnisse waren noch besser als im Beispiel 3. 50

50

55

60

65

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5 (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Kurt W. Roth
- (B) STRASSE: Kaiser-Friedrich-Ring 33
- (C) ORT: Wiesbaden
- 10 (E) LAND: BRD
- (F) POSTLEITZAHL: D-65185

- (A) NAME: Christian Drosten
- 15 (B) STRASSE: Robert-Mayer-Str. 57
- (C) ORT: Frankfurt M.
- (E) LAND: BRD
- (F) POSTLEITZAHL: D-60486

20 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zum Nachweis
von HBV

25 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Tape
- 30 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(EPA)

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 40 (A) LÄNGE: 3220 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

50

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- 55 (A) ORGANISMUS: Hepatitis B Virus
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Konsensus

60

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ACTCCACAAC CTTCCACCAA ACTCTGCAAG ATCCCAGAGT GAGGGGCCTG
TATTTTCCTG 60

65

DE 198 35 856 A 1

CTGGTGGCTC CAGTTCAGGA ACAGTAAACC CTGTTCCGAC TACTGCCTCT
CCCATATCGT 120

CAATCTTCTC GAGGACTGGG GACCCTGCGC CGAACATGGA GAACATCACA
TCAGGATTCC 180

TAGGACCCCT GCTCGTGTTA CAGGCGGGGT TTTTCTTGTT GACAAGAATC
CTCACAATAC 240

CACAGAGTCT AGACTCGTGG TGGACTTCTC TCAATTTTCT AGGGGGAACA
CCCGTGTGTC 300

TTGGCCAAAA TTCGCAGTCC CCAACCTCCA ATCACTCACC AACCTCTTGT
CCTCCAACCT 360

GTCCTGGTTA TCGCTGGATG TGTCTGCGGC GTTTTATCAT CTTCTCTTTC
ATCCTGCTGC 420

TATGCCTCAT CTTCTTGTTG GTTCTTCTGG ACTATCAAGG TATGTTGCCC
GTTTGTCTC 480

TAATTCCAGG ATCATCAACC ACCAGCACGG GACCATGCAA GACCTGCACG
ACTCCTGCTC 540

AAGGAACCTC TATGTTTCCC TCCTGTTGCT GTACAAAACC TTCGGACGGA
AACTGCACCT 600

GTATTCCCAT CCCATCATCC TGGGCTTTTCG GAAAATTCCT ATGGGAGTGG
GCCTCAGTCC 660

GTTTCTCCTG GCTCAGTTTA CTAGTGCCAT TTGTTCAAGT GTTCGTAGGG
CTTTCCCCCA 720

CTGTTTGGCT TTCAGTTATA TGGATGATGT GGTATTGGGG GCCAAGTCTG
TACAGCATCT 780

TGAGTCCCTT TTTACCGCTG TTACCAATTT TCTTTTGTCT TTGGGTATAC
ATTTAAACCC 840

TAACAAAACA AAAAGATGGG GTTACTCCCT AACTTCATG GGATATGTAA
TTGGAAGTTG 900

GGGGACATTG CCACAAGAAC ATATTGTACA AAAAATCAAA GAATGTTTTA
GAAAACTTCC 960

TGTAAACAGG CCTATTGATT GGAAAGTATG TCAACGAATT GTGGGTCTTT
TGGGCTTTGC 1020

TGCCCCTTTT ACACAATGTG GTTATCCTGC TTTAATGCCT TTGTATGCAT
GTATTCAAGC 1080

TAAGCAGGCT TTCACTTTCT CGCCAACTTA CAAGGCCTTT CTGTGTAAAC
AATACCTGAA 1140

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 198 35 856 A 1

CCTTTACCCC GTTGCCCGGC AACGGCCAGG TCTGTGCCAA GTGTTTGCTG
 ACGCAACCCC 1200
 5 CACTGGCTGG GGCTTGGCCA TAGGCCATCA GCGCATGCGT GGAACCTTTG
 TGGCTCCTCT 1260
 GCCGATCCAT ACTGCGGAAC TCCTAGCCGC TTGTTTTGCT CGCAGCAGGT
 10 CTGGAGCAAA 1320
 CCTTATCGGG ACTGACAACT CTGTTGTCCT CTCCCGCAAA TATACATCGT
 TTCCATGGCT 1380
 15 GCTAGGCTGT GCTGCCAACT GGATCCTGCG CGGGACGTCC TTTGTTTACG
 TCCCGTCGGC 1440
 20 GCTGAATCCC GCGGACGACC CGTCTCGGGG CCGCTTGGGG CTCTACCGTC
 CCCTTCTCCG 1500
 TCTGCCGTTT CGGCCGACCA CGGGGCGCAC CTCTCTTTAC GCGGACTCCC
 25 CGTCTGTGCC 1560
 TTCTCATCTG CCGGACCGTG TGCACTTCGC TTCACCTCTG CACGTCGCAT
 GGAGACCACC 1620
 30 GTGAACGCCC ACCAGATCTT GCCCAAGGTC TTACATAAGA GGACTCTTGG
 ACTCTCAGCA 1680
 ATGTCAACGA CCGACCTTGA GGCATACTTC AAAGACTGTG TGTTTAAGGA
 35 CTGGGAGGAG 1740
 TTGGGGGAGG AGATTAGGTT AAAGGTCTTT GTACTAGGAG GCTGTAGGCA
 TAAATTGGTC 1800
 40 TGCGCACCAG CACCATGCAA CTTTTTCACC TCTGCCTAAT CATCTCTTGT
 TCATGTCCTA 1860
 45 CTGTTCAAGC CTCCAAGCTG TGCCTTGGGT GGT TTGGGGC ATGGACATTG
 ACCCTTATAA 1920
 AGAATTTGGA GCTTCTGTGG AGTTACTCTC TTTTTTGCCT TCTGACTTCT
 50 TTCCTTCTGT 1980
 TCGAGATCTC CTAGACACCG CCTCAGCTCT GTATCGGGAG GCCTTAGAGT
 CTCCTGAGCA 2040
 55 TTTGTTTACC TCACCATACT GCACTCAGGC AAGCTATTCT GTGCTGGGGG
 GAATTAATGA 2100
 60 CTCTAGCTAC CTGGGTGGGT AGTAATTTGG AAGATCCAGC ATCCAGGGAA
 CTAGTAGTCA 2160
 GTTATGTCAA CACTAATATG GGCCTAAAGA TCAGGCAACT ATTGTGGTTT
 65 CACATTTCTT 2220

DE 198 35 856 A 1

GTCTTACTTT TGGAAGAGAA ACTGTTCTTG AGTATTGGT GTCTTTTGGG
GTGTGGATTC 2280

GCACTCCTCC AGCTTATAGA CCACCAAATG CCCCTATCTT ATCAACACTT
CCGGAAACTA 2340

CTGTTGTTAG ACGACGGGAC CGAGGCAGGT CCCCTAGAAG AAGAACTCCC
TCGCCTCGCA 2400

GACGAAGGTC TCAATCGCCG CGTCGCAGAA GATCTCAATC TCGGGAATCT
CAATGTTAGT 2460

ATTCTTGGG CTCATAAGGT GGGAAACTTT ACGGGGCTTT ATTCTTCTAC
TGTACCTGTC 2520

TTTAATCCTG ATTGGCAAAC TCCCTCTTTT CCTAACATTC ATTTACAGGA
AGACATTATT 2580

AATAGATGTG AACAAATTTGT GGGCCCACTT ACAGTAAATG AAAAAAGAAG
ATTAAAATTA 2640

ATTATGCCTG CTAGGTTTTA TCCTAATGTT ACCAAATATT TGCCCTTGGG
TAAAGGTATT 2700

AAACCTTATT ATCCAGAACA TGTAGTTAAT CATTACTTCC AACTAGACA
TTATTTACAT 2760

ACTCTATGGA AGGCGGGTAT TTTATATAAG AGAGAACTA CACGTAGCGC
CTCATTTTGT 2820

GGGTCACCAT ATTCTTGGGA ACAAGAGCTA CAGCATGGGA GGTGGTCTT
CCAAACCTCG 2880

AAAAGGCATG GGGACGAATC TTTCTGTCCC CAATCCTCTG GGATTCTTTC
CCGATCACCA 2940

GTTGGATCCT GCCTTCAGAG CCAACTCAGA AAATCCAGAT TGGGACTTCA
ACCCCAACAA 3000

GGACAACTGG CCAGACGCCA ACAAGGTAGG AGCGGGAGCA TTCGGGCCAG
GGTTCACCCC 3060

ACCACACGGA GGTCTTTTGG GGTGGAGCCC TCAGGCTCAG GGCATACTAA
CAACCGTGCC 3120

AGCAGATCCT CCTCCTGCCT CCACCAATCG GCAGTCAGGA AGGCAGCCTA
CCCCCTCTC 3180

TCCACCTCTA AGAGACACTC ATCCTCAGGC CATGCAGTGG
3220

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 oder 23 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetic"

- (iv) MERKMAL:

- (D) SONSTIGE ANGABEN: n = 0 oder 1;

$N_1 = C$ oder G , $N_2 = C$ oder T , $N_3 = C$ oder T

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

(C) AACCTN₁N₂G TCCTCCAAN₃T TGT
 22/23

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetic"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AACCTCCTGT CCTCCAATT GT
 22

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetic"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CAACCTCTTG TCCTCCAATT TGT
 23

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear 5
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetic" 10
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:
 CAACCTGTTG TCCTCCAATT TGT
 23 15
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6: 20
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear 25
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetic" 30
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:
 GATGAGGCAT AGCAGCAGGA T
 21 35
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7: 40
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear 45
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetic" 50
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:
 AACGCCGCAG ACACATCCAG CGAT
 24 55
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8: 60
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 382 Basenpaare 65

(B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GTGTGTCTCG GCCAAAATTC GCAGTCCCCA ACCTCCAATC ACTCACCAAC
 CTCCTGTCTT 60

15

CCAACTTGTC CTGGTTTGAC TGGTCAGTGT GGTCCGTCGT TTATCATCTT
 CCTCTTCATC 120

20

CTGCTGCTAT GCCTCATCTT CTTATTGGTT CTTCTGGATT ATCAAGGTAT
 GTTGCCCGTT 180

25

TGTCCTCTAA TTCCAGGATC AACAACAACC AGTACGGGAC CACGCAAAAC
 CTGCACGACT 240

CCTGCTCAAG GCAACTCTAT GTTCCCTCA TGTGCTGTA CAAAACCTAC
 GGATGGAAAT 300

30

TGCACCTGTA TTCCCATCCC ATCGTCCTGG GCTTTCGCAA AATACCTATG
 GGAGTGGGCC 360

35

TCAGTCCGTT TCTCCTGGCT CA
 382

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

45

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetic"

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ACGACGGACC AACTGACCA GTCA
 24

60

Patentansprüche

65

1. Verfahren zum Nachweis von HBV in einer Probe, welches den Schritt des Aussetzens der Probe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) umfaßt, wobei das durch die PCR zu amplifizierende DNA-Stück einem Teil des HBV-Genoms entspricht, der im Bereich von der Position 242 bis zur Position 482 des HBV-Genoms, gezählt von der einzigen EcoRI-Schnittstelle im Genom, liegt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zu amplifizierende DNA eine Länge von 50 bis 100 Basenpaare aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das für die PCR eingesetzte Primer-Paar die gleiche Schmelztempera-

tur oder eine um höchstens 2,5°C unterschiedliche Schmelztemperatur aufweist.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das durch die PCR zu amplifizierende DNA-Stück einem Teil des HBV-Genoms entspricht, der im Bereich von der Position 340 bis zur Position 431 des HBV-Genoms, gezählt von der einzigen EcoRI-Schnittstelle im Genom, liegt.
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Nachweis von HBV durch das Anbinden einer Oligonukleotid-Sonde an die amplifizierte DNA-Sequenz erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Oligonukleotid-Sonde bereits zur PCR-Reaktion zugegeben wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Nachweis durch eine auf einer Markierung an der Oligonukleotid-Sonde beruhenden Signaländerung erfolgt, welche sich durch den Abbau der markierten Oligonukleotid-Sonde während der PCR-Reaktion ergibt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Schmelzpunkt der Oligonukleotid-Sonde mindestens 5°C über dem Schmelzpunkt der Primer liegt.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei als PCR-Primer Oligonukleotide mit der SEQ ID Nr. 2 sowie SEQ ID Nr. 6 oder Sequenzhomologe dieser Oligonukleotide mit der Maßgabe, daß die Sequenzhomologe unter den gewählten PCR-Bedingungen ein mit der zu amplifizierenden DNA spezifisches DNA-Hybrid bilden, eingesetzt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Primer mit der SEQ ID Nr. 2 aus einer Zusammensetzung aus Oligonukleotiden besteht, die die Oligonukleotide mit den SEQ ID Nrn. 3, 4 und 5 umfassen.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Primer zusammen mit einer Oligonukleotid-Sonde der SEQ ID Nr. 7 oder der zur SEQ ID Nr. 7 komplementären Sequenz oder Sequenzhomologe dieser Oligonukleotide mit der Maßgabe, daß die Sequenzhomologe unter den gewählten PCR-Bedingungen ein mit der zu amplifizierenden DNA spezifisches DNA-Hybrid bilden, eingesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Oligonukleotid-Sonde der SEQ ID Nr. 7 an einem Ende mit einem Fluoreszenz-Reporter und am anderen Ende mit einem Fluoreszenz-Quencher markiert ist.
13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur Kontrolle in der PCR eine Kontrollsequenz coamplifiziert wird, die zumindest in der Primerregion mit der zu amplifizierenden HBV-Sequenz homolog ist, im amplifizierten Bereich jedoch gegenüber der entsprechenden HBV-Sequenz mutiert ist.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die coamplifizierte Kontrollsequenz mit Ausnahme der zum Hybridisierungsnachweis herangezogenen Sondenregion mit der zu amplifizierenden HBV-Sequenz identisch ist, und daß die Kontrollsequenz mit einer für den mutierten Bereich spezifischen Oligonukleotid-Sonde nachgewiesen wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Kontrollsequenz in der PCR aus einem DNA-Stück coamplifiziert wird, welches die Sequenz mit der SEQ ID Nr. 8 oder Sequenzvarianten davon umfaßt mit der Maßgabe, daß die möglichen Sequenzvarianten mit dem Sequenzbereich von Position 47 bis Position 138 der SEQ ID Nr. 8 identisch sind, und daß als Kontrollsequenzspezifische Oligonukleotid-Sonde ein Oligonukleotid mit der SEQ ID Nr. 9 eingesetzt wird.
16. Oligonukleotid, ausgewählt aus der aus folgenden Oligonukleotiden bestehenden Gruppe:
 - (a) Oligonukleotid mit der Nukleotidsequenz von SEQ ID Nr. 2,
 - (b) Oligonukleotid mit der Nukleotidsequenz von SEQ ID Nr. 6,
 - (c) Oligonukleotid mit der Nukleotidsequenz von SEQ ID Nr. 7 oder der zur SEQ ID Nr. 7 komplementären Sequenz und
 - (d) Oligonukleotid mit der Nukleotidsequenz von SEQ ID Nr. 9 oder der zur SEQ ID Nr. 9 komplementären Sequenz.
17. Oligonukleotid nach Anspruch 16, wobei die Oligonukleotide von (c) und (d) markiert sind.
18. Oligonukleotid nach Anspruch 17, wobei die Markierung eine Markierung mit einem Fluoreszenz-Reporter am 5'-Ende und eine Markierung mit einem Fluoreszenz-Quencher am 3'-Ende umfaßt.
19. Oligonukleotid-Zusammensetzung, umfassend mindestens zwei der in den Ansprüchen 16 bis 18 definierten Oligonukleotide.
20. Oligonukleotid-Zusammensetzung nach Anspruch 19 mit den Oligonukleotiden der SEQ ID Nrn. 2 und 6.
21. Oligonukleotid-Zusammensetzung nach Anspruch 19 oder 20, wobei das Oligonukleotid mit der SEQ ID Nr. 2 selbst aus einer Zusammensetzung der Oligonukleotide von SEQ ID Nr. 3, 4 und 5 besteht.
22. Plasmid, enthaltend ein DNA-Stück mit der Sequenz von SEQ ID Nr. 8 oder Sequenzvarianten davon mit der Maßgabe, daß die möglichen Sequenzvarianten mit dem Sequenzbereich von Position 47 bis Position 138 der SEQ ID Nr. 8 identisch sind.
23. Test-Kit zum Nachweis von HBV, enthaltend:
 - (a) eine Oligonukleotid-Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 19 bis 21,
 - (b) für eine PCR-Reaktion erforderliche Nukleotide,
 - (c) eine hitzestabile DNA-Polymerase.
24. Test-Kit nach Anspruch 23, enthaltend ferner:
 - (d) ein Plasmid gemäß Anspruch 22.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1a

EUROHEP 1

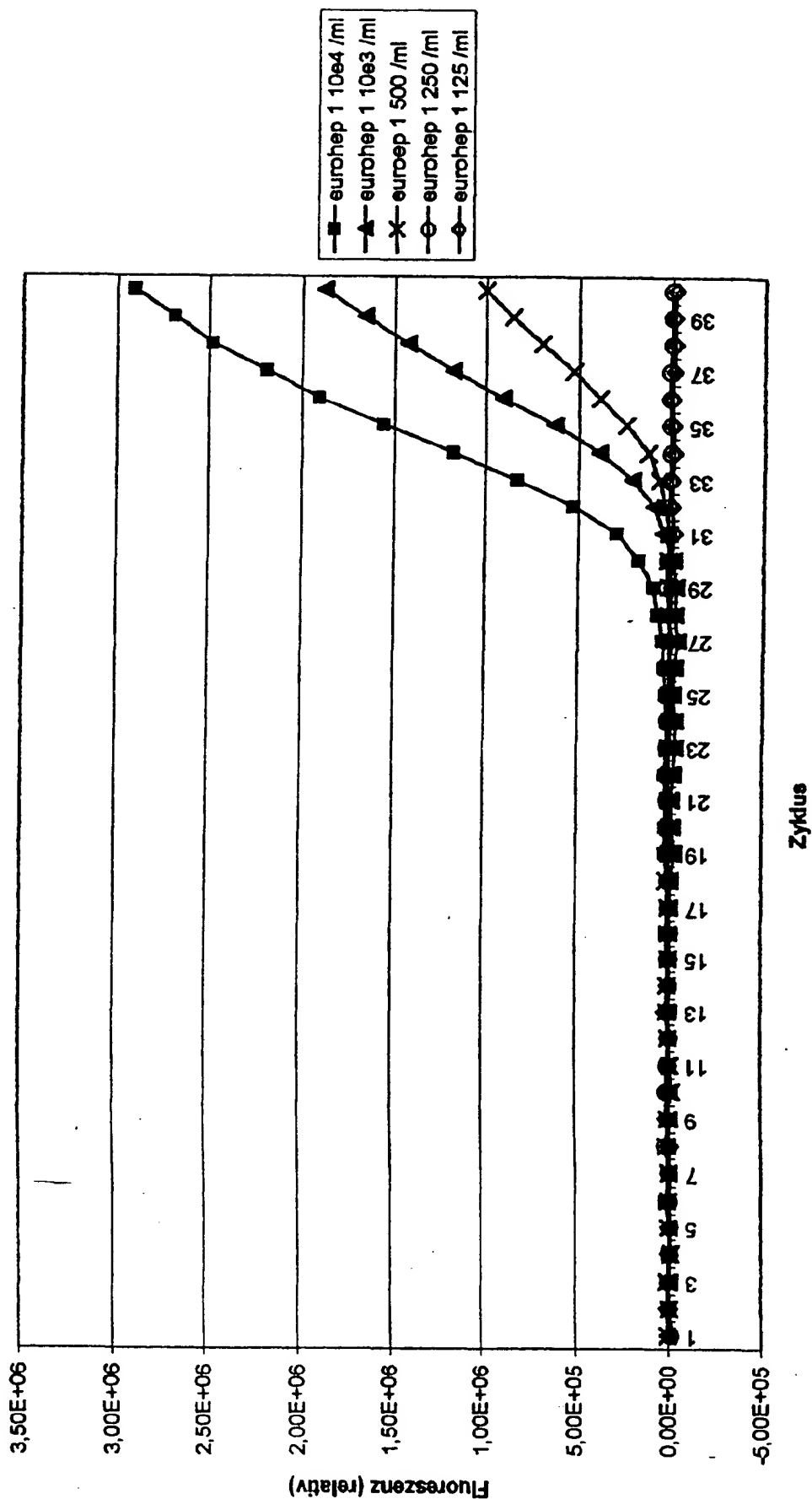
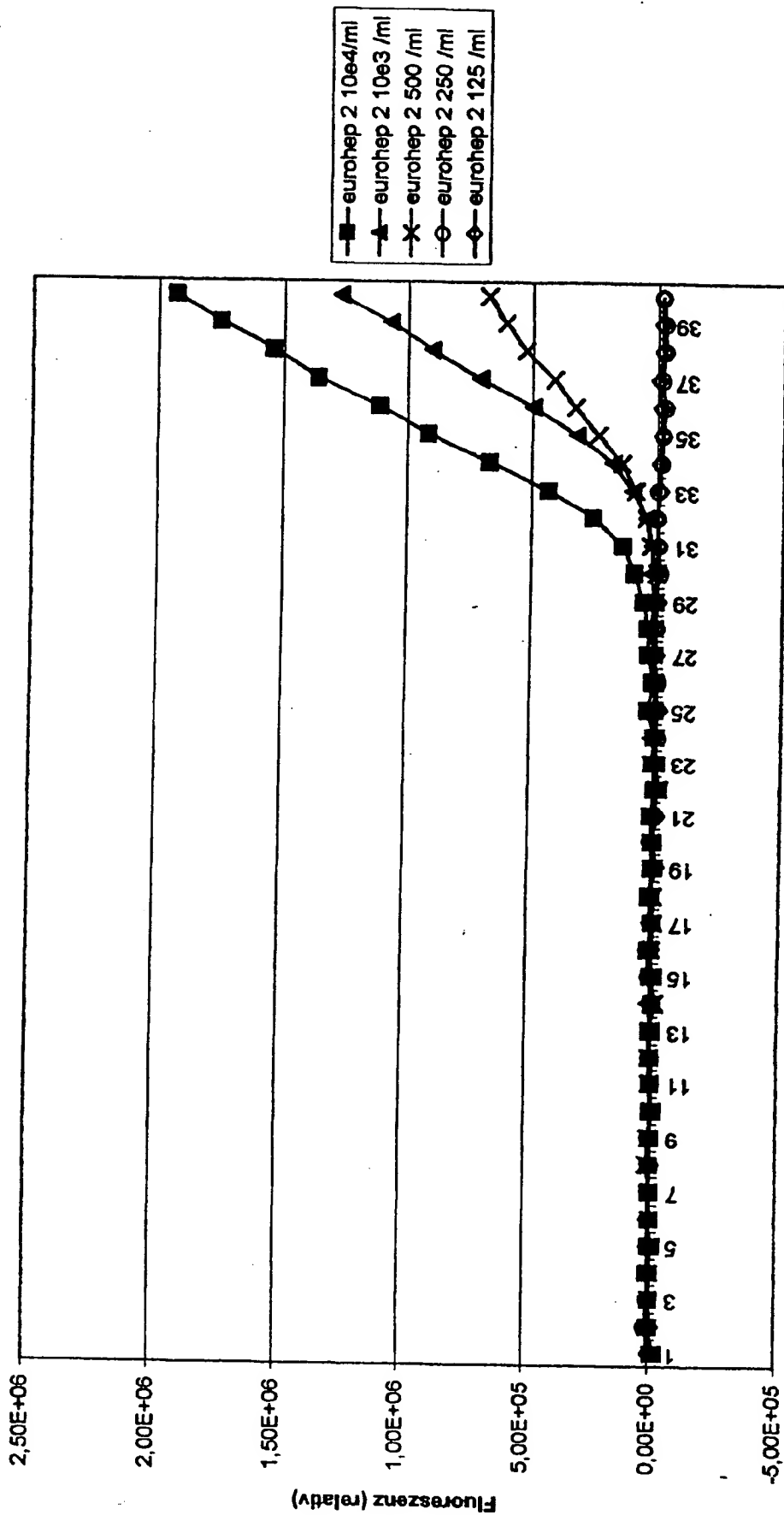


Fig. 1b

EUROHEP 2



Zyklus

Fig. 1C

Negativkontrollen

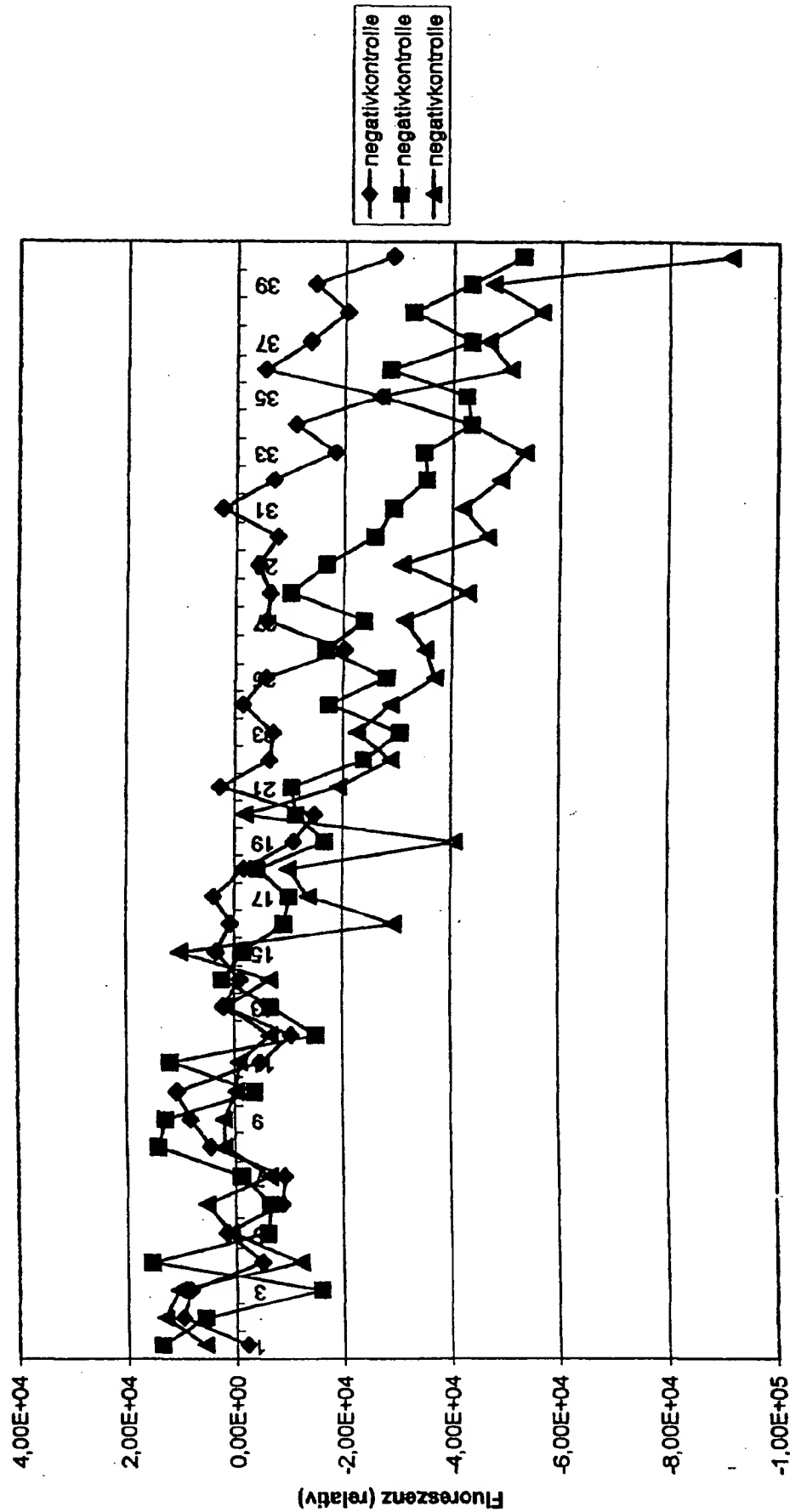


Fig. 1d

EUROHEP 1 Inhibitionskontrolle

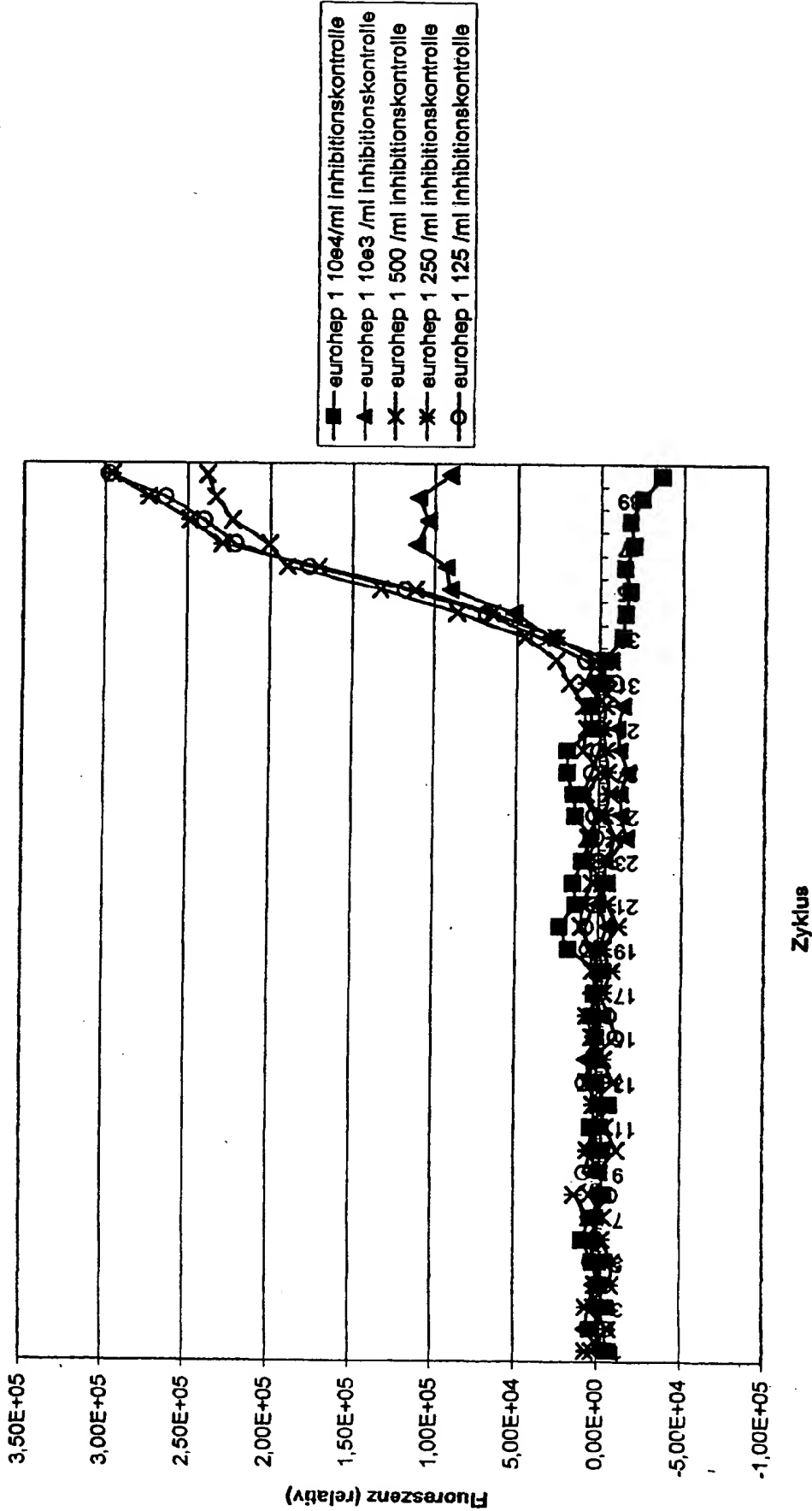


Fig. 1e

EUROHEP 2 Inhibitionskontrolle

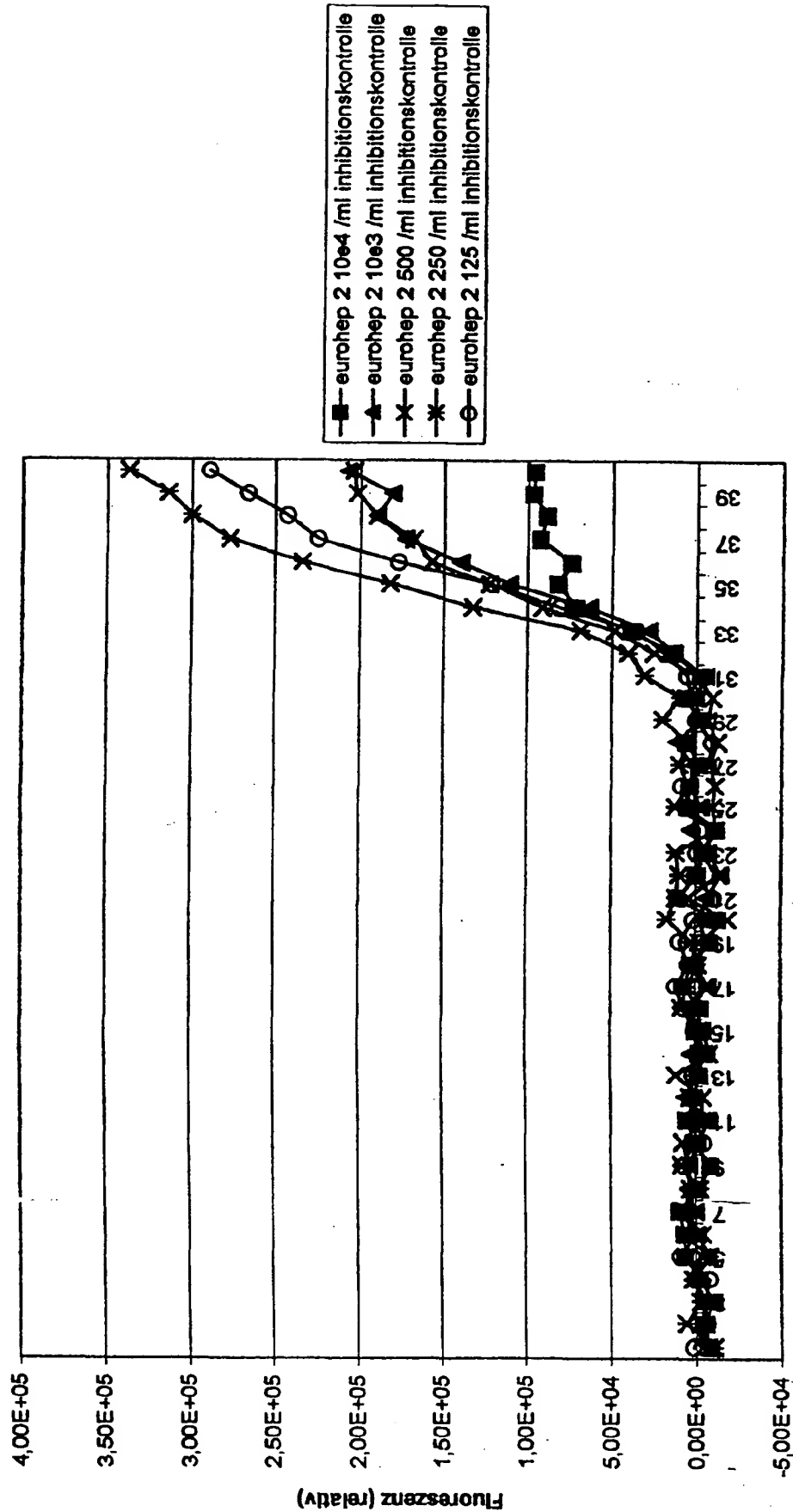


Fig. 1f

Wildtyp-Negativkontrollen: Inhibitionskontrolle

